



KONGERIKET NORGE

The Kingdom of Norway

PCT/NO 0 0 7 0 0 2 8 6

REC'D 2 5 SEP 2000

WIPO

PCT

NO 00/00286

# Bekreftelse på patentsøknad nr

*Certification of patent application no*

1999 4228

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1999.09.01

*It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1999.09.01*

2000.09.08

*Freddy Strømmen*

Freddy Strømmen  
Seksjonsleder

*Ellen B. Olsen*

Ellen B. Olsen



**PATENTSTYRET**  
Styret for det industrielle rettsvern



**PATENTSTYRET**  
Styret for det industrielle rettsvern

ADRESSE

Postboks 8160 Dep.  
Københavnsgaten 10  
0033 Oslo

TELEFON

22 38 73 00

TELEFAX

22 38 73 01

BANKGIRO

8276 01 00 192

FORETAKSNUMMER

971526157

01.SEP99 994228

## Søknad om patent

adsskriv

la - d

Utfylles av styret

Behandlermedlem

KF

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q

Søkers/fullmektigers referanse  
(angis hvis ønsket):

Oppfinnelsens  
benevnelse:

Hvis søknaden er  
en internasjonal søknad  
som videreføres etter  
patentlovens § 31:

Søker:

Navn, bopel og adresse.  
(Hvis patent søkes av flere:  
opplysning om hvem som skal  
være bemyndighet til å motta  
meddelelser fra Styret på vegne  
av søkerne).

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Oppfinner:

Navn og (privat-) adresse

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Den internasjonale søknads nummer

Den internasjonale søknads inngivelsesdag

Oddbjørn Gjelsnes  
Gladvoll Terr 2  
1168 Oslo

Øystein Rønning  
Sømun 7B  
0493 Oslo

Øystein Rønning  
Sømun 7B  
0493 Oslo

Oddbjørn Gjelsnes  
Gladvoll Terr 2  
1168 Oslo

Hvis søknad tidligere  
er inngitt i eller  
utenfor riket:

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Hvis avdelt søknad:

Hvis utskilt søknad:

Deponert kultur av  
mikroorganisme:

Utlevering av prøve av  
kulturen:

994228

Angivelse av tegnings-  
figur som ønskes  
publisert sammen med  
sammendraget

Prioritet kreves fra dato ..... sted ..... nr. ....

Prioritet kreves fra dato ..... sted ..... nr. ....

Prioritet kreves fra dato ..... sted ..... nr. ....

Den opprinnelige søknads nr.: ..... og deres inngivelsesdag .....

Den opprinnelige søknads nr.: ..... begjært inngivelsesdag .....

☐ Søknaden omfatter kultur av mikroorganisme

☐ Prøve av den deponerte kultur av mikroorganisme skal bare utleveres til en særlig sakkyndig,

jfr. patentlovens § 22 åttende ledd og patentforskriftenes § 38 første ledd

Fig. nr. ....

1c

# Metode og innretning for telling av celler i urin

## Beskrivelse av oppfinnelsen

Oddbjørn Gjelsnes og Øystein Rønning  
Optoflow AS

KONFIDENSIELT  
PATENTSTYRET  
01.SEP99 994228

Personer med urinveisinfeksjon har celler i urinen som normalt ikke skal finnes der. Slike celler kan være bakterier eller sopp. I tillegg kan pasientens egne celler (somatiske celler) finnes i urinen, slike som leukocytter eller epitelceller.

I dag benyttes vanligvis dyrkingsmetoder for å påvise bakterier og sopp i urinen. Svaret på slike analyser foreligger først dagen etter prøvetakingen. I den foreliggende oppfinnelsen får man svaret i løpet av fem minutter.

Oppfinnelsen består av følgende trinn:

1. Urinprøven blandes med fikseringsvæske slik at alle cellene dør.
2. Blandingen fra pkt 1 tilsettes en bufferløsning som er formulert slik at den fremmer binding av fluorochrom til cellenes nukleinsyrer (DNA/RNA) (se pkt 3), men samtidig forhindrer binding til andre cellulære bestandeler.
3. Blandingen fra pkt 2 tilsettes et fluorochrom som binder seg spesifikt til cellenes nukleinsyrer.
4. Blandingen fra pkt 3 analyseres i en innretning som måler lysspredning og fluorescens fra enkeltceller (f. eks. et flow cytometer). Eksitasjonslyset er av en slik bølgelengde at autofluorescens fra cellene er uten betydning.
5. Resultatene presenteres på et display der de fluorescerende partiklene (cellene) fremkommer adskilt fra partikler uten fluorescens, samtidig som det absolute tallet blir vist. Celler i det laveste størrelsesområdet presenteres som bakterier, celler i det midlere størrelsesområdet presenteres som gjær, mens celler i det øverste størrelsesområdet presenteres som somatiske celler.

## CLAIMS

1. En metode bestående av trinn 1-5.
2. En innretning som utfører trinn 1-5 automatisk (uten manuelle trinn etter at urinprøven er satt inn i innretningen)



No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	1 (6)

TOPRO-3  
CONFIDENTIELT

## 1. Introduction

The number of cells in a sample of urine, (bacteria, yeast or somatic cells), may be counted in MICROCYTE<sup>®</sup> after fixation and staining of cellular nucleic acids with a fluorochrom.

Nucleic acid stains that are taken up by permeant cells may be used to stain the fixed (permeant) cells. The number of fluorescent cells are then counted in MICROCYTE<sup>®</sup> and taken as a measure of total cell count. In this procedure TOPRO-3<sup>1</sup> is used as such a stain.

In order to minimise unspecific staining it is important that the concentration of stain is used at a minimum level that still give acceptable staining of the dead cells. The concentration of stain mentioned below is a suggestion that has been established in Optoflow's laboratory. For certain organisms or applications it is recommended that an optimised staining protocol is worked out that may deviate from our protocol.

**NOTE:** This protocol is intended for *in vitro* research use only, and not for use in household, diagnostic or *in vivo* applications.

## 2. Equipment/Reagents

### 2.1. Stain

TOPRO-3 from Molecular Probes, Inc. (Catalogue no. T-3605) is supplied as a 1 mM solution in DMSO. Prepare the following working solutions:

- 20  $\mu$ M in DMSO (20  $\mu$ l stock solution TOPRO-3 into 1.0 ml DMSO).

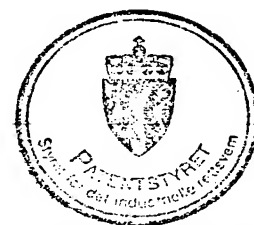
### 2.2. Buffers/solutions

- Acetone (fixation solution)
- TBE-buffer pH 8

90 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane)	(10.8 g/l)
90 mM boric acid	( 5.5 g/l)
2.5 mM EDTA	(0.73 g/l)

Adjust to pH 8 with 6 N HCl.

- Particle free water (distilled water filtered through 0.22  $\mu$ m disposable filter).
- 1 M NaOH (cleaning solution). (40 g/l)



# MICROCYTE<sup>®</sup> application note

optoflow

No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	2 (6)

## 2.3. Disposables

- Micro centrifuge tubes 1.5 ml.
- Micro pipettes with tips.
- Gloves.
- Capped tubes 10 and 50 ml (for sample preparation).

## 2.4. Equipment

- Micro centrifuge
- Whirl mixer
- Rack for various tubes

## 3. Safety

- TOPRO-3 binds to nucleic acids and should therefore be regarded as a possible mutagen and used with appropriate care.
- DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into skin and tissues and disposable gloves should always be used when handling.
- See User's Manual (part no 200905) for general instrument safety.

## 4. Procedure

### 4.1. Staining

- Add 100 µl of acetone and whirl mix.
- Add 800 µl of staining buffer (TBE, pH 8).
- Add 10 µl of stain from the working solution of TOPRO-3. (This gives a final concentration of 0.2 µM of TOPRO-3.)
- Whirl mix and incubate in the dark at room temperature for one minute.

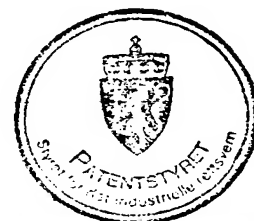
### 4.2. Counting

- Instrument settings: (For detailed instruction of operating the MICROCYTE<sup>®</sup> please see user's manual).

**Display:** "scatter"

**Threshold:** "off" (If a lot of small "background" particles appear, threshold should be turned "on" and adjusted to discriminate these particles).

**Gain:** "log/log"



# MICROCYTE<sup>®</sup> application note

optoflow

No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	3 (6)

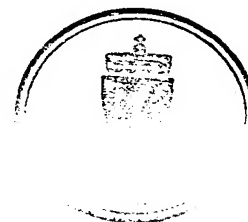
- Whirl mix and count on MICROCYTE<sup>®</sup>. Set ROI 1 from 20 to 120 for counting bacteria and ROI 2 from 120 to 220 for counting somatic cells.
- Register the counts in each ROI manually or by optional additional PC and MICROCYTE 2000 Software. Gated (fluorescent) counts represent the number of cells per ml. Multiply by 10 to account for the dilution factor.
- Between each sample backflush ("STOP/PURGE") for at least 5 seconds.

## 4.3. Cleaning

- Fill 1 ml of 1 M NaOH ("RUN/PURGE") into the MICROCYTE<sup>®</sup>, push "STOP" and leave for 1 minute.
- Backflush ("STOP/PURGE") for at least 10 seconds.
- Run filtered water for at least 15 minutes. Check that the background level is acceptable (see 4.3). Leave with water.

## 5. References

1. Molecular Probes, Inc., Literature, Handbook 8.1 Nucleic Acid Stains.



No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	4 (6)

## 6. Examples

### 6.1. Negative urine.

Urine from healthy volunteer was analysed according to this procedure.

A printout of the file data from the software MICROCYTE 2000 is shown below. In ROI 1 1.26 e+03 cells per ml are stained and in ROI 2 9.03e+03 cells per ml are stained. Taken the dilution factor into account, the number of cells per ml of urine is in ROI 1 (bacteria): 1.26e+04 and in ROI 2 (somatic cells): 9.03e+04.

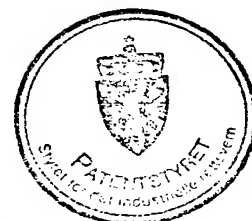
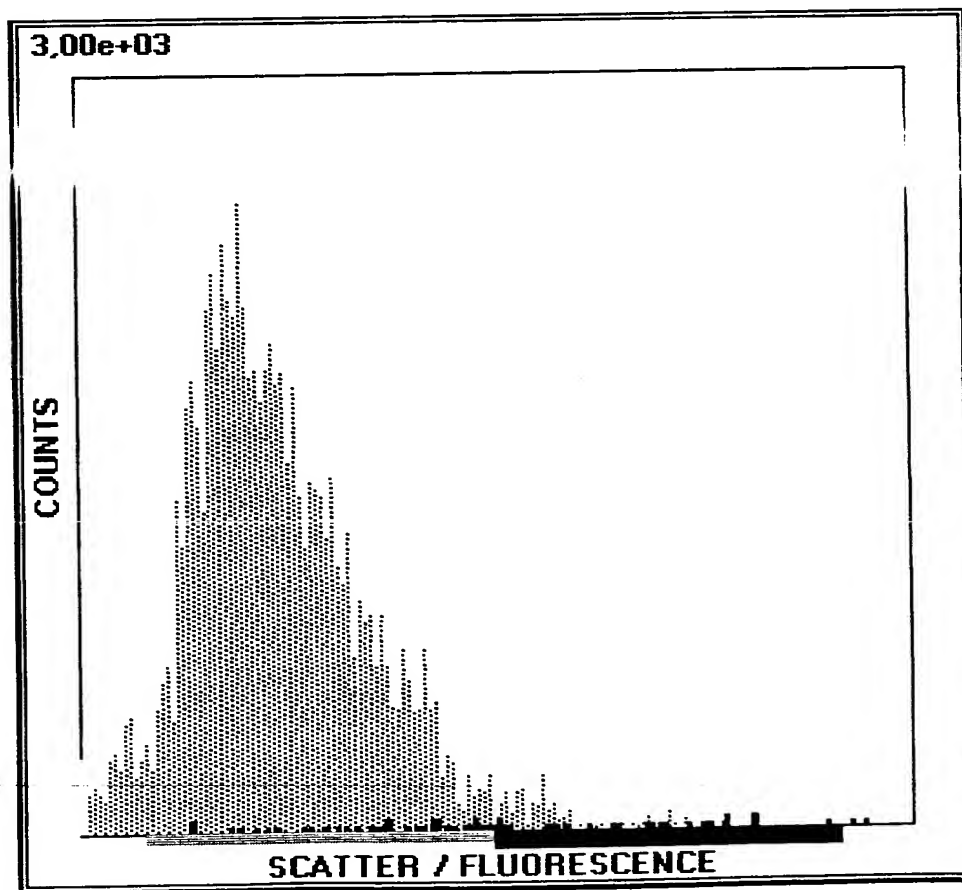
Date: 02.06.99 Time: 13:53:33  
Counting time: 00:00:58 Counting cycles: 31

Operator:

File: C:\MC 2000\020699\ØR.mcf

Description:

REGION OF INTEREST	COUNTS/ml	
1	1,22e+05	TOTAL
	1,26e+03	GATED
2	4,55e+03	
	9,03e+02	



# MICROCYTE<sup>®</sup> application note

optoflow

No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	5 (6)

KONFIDENSIELT

## 6.2. Urine infected with bacteria

Urine sample from patient was analysed according to this procedure.

A printout of the file data from the software MICROCYTE 2000 is shown below. In ROI 1  $1.31 \times 10^6$  cells per ml are stained and in ROI 2  $8.43 \times 10^3$  cells per ml are stained. Taken the dilution factor into account, the number of cells per ml of urine is in ROI 1 (bacteria):  $1.31 \times 10^7$  and in ROI 2 (somatic cells):  $8.43 \times 10^4$ .

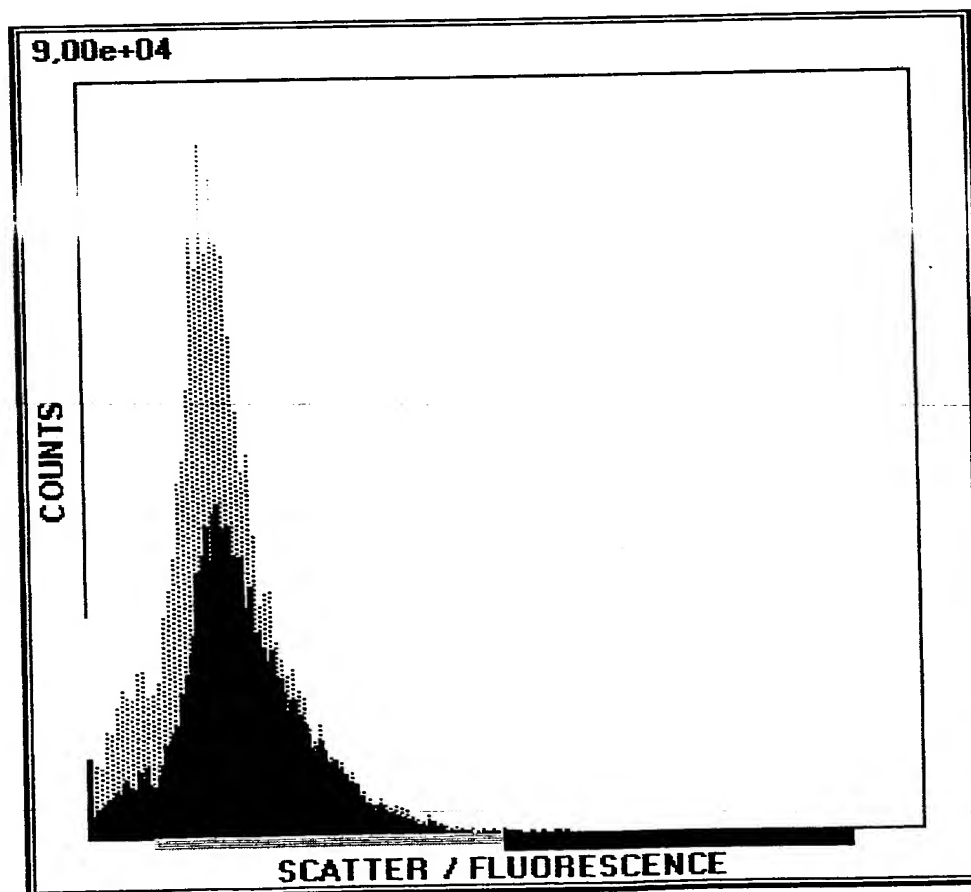
Date: 02.06.99 Time: 13:37:50  
Counting time: 00:00:58 Counting cycles: 30

Operator:

File: C:\MC 2000\020699\18374.mcf

Description:

REGION OF INTEREST	COUNTS/ml	
1		2
2,30e+06	TOTAL	1,20e+04
1,31e+06	GATED	8,43e+03





# MICROCYTE<sup>®</sup> application note

## optoflow

No.	Title	Version no.	Date	Page
4.01	Cells in urine	1	1999-08-30	6 (6)

### 6.3 Urine containing somatic cells.

Urine sample from patient was analysed according to this procedure.

A printout of the file data from the software MICROCYTE 2000 is shown below.  
In ROI 1 1.85 e+05 cells per ml are stained and in ROI 2 9.64e+05 cells per ml are stained. Taken the dilution factor into account, the number of cells per ml of urine is in ROI 1 (bacteria): 1.85 e+06 and in ROI 2 (somatic cells): 9.64e+06.

KONFIDENSIËLT

Date: 14.06.99 Time: 13:18:27  
Counting time: 00:00:39 Counting cycles: 21

Operator:

File: C:\MC 2000\140699\19566.mcf

Description:

REGION OF INTEREST	COUNTS/ml	
1	9,62e+06	TOTAL
	1,85e+05	GATED
2	1,27e+06	
	9,64e+05	

